

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-283151

(43)Date of publication of application : 29.10.1996

(51)Int.Cl.

A61K 31/235
A61K 31/235
A61K 31/235
A61K 31/60
C07C 69/84

(21)Application number : 07-086617

(71)Applicant : KAO CORP

(22)Date of filing : 12.04.1995

(72)Inventor : HASE TADASHI
MURASE TAKATOSHI
SHIBUYA YUSUKE
NISHIZAWA YOSHINORI
TOKIMITSU ICHIROU

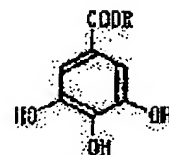
(54) CELL ADHESION INHIBITOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a cell adhesion inhibitor, an immunosuppressant agent and a cancer metastases inhibitor containing a gallic acid ester as an active ingredient and having high safety,

CONSTITUTION: The cell adhesion inhibitor contains a compound of the formula (R is a hydroxy-substitutable 1-24C alkyl or alkenyl (e.g., methyl gallate) as an active ingredient. The compound of the formula controls manifestation of a cell surface molecule participating to cell adhesion, has excellent inhibitory action on cell adhesion represented by that between leukocyte-vascular endothelia cell and is useful for suppressing blocking and rejection of transplant, treatment of an autoimmune disease and preventing cancer metastases.

The cell adhesion inhibitor is further mixed with a conventional excipient and an additive besides the compound of the formula into a solid preparation such as tablet, powder, capsule, suppository, troche, etc., and a liquid preparation such as syrup, emulsion, cream, gel, paste, spray, injection, etc. A daily dose is 0.01-100mg/kg calculated as the gallic acid ester.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.08.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

BEST AVAILABLE COPY

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-283151

(43)公開日 平成8年(1996)10月29日

(51)Int.Cl. ^a	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/235	ADS		A 6 1 K 31/235	ADS
	ABC			ABC
	ADU			ADU
31/60			31/60	
C 0 7 C 69/84		9546-4H	C 0 7 C 69/84	
審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全 8 頁)				

(21)出願番号 特願平7-86617

(22)出願日 平成7年(1995)4月12日

(71)出願人 000000918

花王株式会社

東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号

(72)発明者 長谷 正

栃木県宇都宮市兵庫塚3-3-19

(72)発明者 村瀬 季利

栃木県芳賀郡市貝町市場4594

(72)発明者 渋谷 祐輔

茨城県西茨城郡岩瀬町明日香2-11 1-A

(72)発明者 西澤 義則

栃木県宇都宮市清原台1-17-10

(74)代理人 弁理士 有賀 三幸 (外3名)

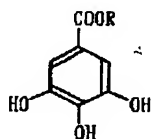
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞接着抑制剤

(57)【要約】

【構成】 次の一般式(1)で表される没食子酸エステルを有効成分とする細胞接着抑制剤、免疫抑制剤及び癌転移抑制剤。

【化1】



(1)

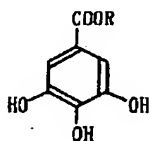
〔Rはヒドロキシ基が置換していてもよいC1~C24の直鎖又は分岐鎖のアルキル基又はアルケニル基〕

【効果】 優れた細胞接着抑制作用を有し、かつ安全性も高いので、移植臓器拒絶反応、自己免疫疾患等の治療及び癌転移予防に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の一般式(1)：

【化1】



(1)

【式中、Rはヒドロキシ基が置換していてもよい炭素数1～24の直鎖又は分岐鎖のアルキル基又はアルケニル基を示す】で表される没食子酸エステルを有効成分とする細胞接着抑制剤。

【請求項2】 上記式(1)の没食子酸エステルを有効成分とする免疫抑制剤。

【請求項3】 上記式(1)の没食子酸エステルを有効成分とする癌転移抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、免疫抑制剤、癌転移抑制剤として有用な細胞接着抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】免疫抑制剤としては従来より、アザチオプリン、ミゾリビン等の代謝拮抗剤、ブレドニゾン等のステロイド、各種抗体、サイクロスポリン、FK506等が用いられている。そして、癌転移抑制剤として有効な物質はない。このように、従来、これら免疫抑制剤及び癌転移抑制剤には、明らかな関連性は認められていなかった。

【0003】ところが最近、各種炎症、免疫反応及び癌転移についての細胞レベルでの研究が進展し、これらの疾患に細胞間接着が大きく関与するとの報告がなされている〔「細胞分子の発現調節と臨床応用」(1991年、メジカルビュー社)、Nature, Vol. 364, 149-151 (1993)、Science, Vol. 247, 456-459 (1990)、Annual Review 免疫 1989, 175-185、Trends in Glycoscience and Glycotechnology, Vol. 4, No. 19, 405-414 (1992)、実験医学 Vol. 10, No. 11, 1402-1413 (1992)、実験医学 Vol. 11, No. 16, 2168-2175 (1993)、Science, Vol. 255, 1125-1127 (1992)等〕。そして、細胞間の接着にはICAM-1、ELAM-1、VCAM-1等の細胞表面接着分子が関与していることも判明している〔Annual Review 免疫 1989, 175-185、感染・炎症・免疫 Vol. 19 (2), 129-153 (1989)、感染・炎症・免疫 Vol. 24 (3), 158-165 (1994)〕。

【0004】これらの細胞接着を抑制する物質としては、細胞表面接着分子に対する抗体やリガンド、N-(フルオレニル-9-メトキシカルボニル)アミノ酢酸、3-デアザアデノシン等が知られているが〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, 355-359 (1991)、Immunopharmacology, 23, 139-149 (1992)、Journal of Biological Chemistry, Vol. 267, No. 13, 9376-9382 (1992)、Journal of Immunology, Vol. 144, No. 2, 653-661 (1990)〕、その活性は未だ満足すべきものではなく、また安全性等にも問題があった。

【0005】

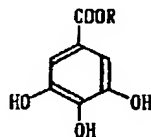
【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、安全性が高く、細胞接着抑制に基づく優れた免疫抑制剤、癌転移抑制剤を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】このような実情において、本発明者は、細胞接着抑制試験及び安全性試験を数多くの化合物について行った結果、没食子酸エステルが優れた細胞接着抑制作用を有し、かつ安全性も高いことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は、次の一般式(1)：

【化2】



(1)

【0008】【式中、Rはヒドロキシ基が置換していてもよい炭素数1～24の直鎖又は分岐鎖のアルキル基又はアルケニル基を示す】で表される没食子酸エステルを有効成分とする細胞接着抑制剤、免疫抑制剤及び癌転移抑制剤を提供するものである。

【0009】ここで、没食子酸エステルは、従来から抗酸化作用、血小板凝集抑制作用、美白作用、線維化抑制作用、コラゲナーゼ阻害作用、ペロキシダーゼ阻害作用などを有することが知られているが、細胞接着抑制作用については全く知られていない。

【0010】一般式(1)で表される没食子酸エステルにおいて、Rはヒドロキシ基が置換していてもよい炭素数1～24の直鎖又は分岐鎖のアルキル基又アルケニル基を示すが、特に炭素数1～10のアルキル基が好ましい。Rとして具体的にはメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、t-ペンチル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル

基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、ノナデシル基、イソヘキシル基、2-エチルヘキシル基、プロベニル基、ブテニル基、ペンテニル基、オレイル基、リノレイニル基、3, 5, 5-トリメチルヘキシル基、3, 7-ジメチルオクチル基、3, 7, 11-トリメチルドデシル基、3-メチル-2-ブテニル基、3, 7-ジメチル-2, 6-オクタジエニル基、シクロヘキシルメチル基、シクロヘキシルエチル基、2-ヒドロキシプロピル基、8-ヒドロキシオクチル基、10-ヒドロキシデシル基、11-ヒドロキシウンデシル基、12-ヒドロキシデシル基、12-ヒドロキシオクタデシル基等を挙げることができる。本発明においては、このうち直鎖アルキル基が好ましい。すなわち没食子酸エステルとしては没食子酸メチル、没食子酸エチル、没食子酸プロピル、没食子酸ブチル、没食子酸オクチル等が好ましい。

【0011】没食子酸エステルは、細胞接着に関与するICAM-1、ELAM-1等の細胞表面分子の発現を抑制し、また優れた白血球-血管内皮細胞間に代表される細胞接着を抑制する作用を有する。さらにまた、細胞毒性、皮膚刺激性が弱く、安全性も高い。従って、没食子酸エステルを有効成分として含有する製剤は、細胞接着抑制に基づき、移植臓器拒絶反応抑制、自己免疫疾患の治療及び癌転移予防等に有用である。

【0012】本発明の製剤は、上記疾患の治療又は予防のため、経口、経腸、非経口、局所投与などのいずれの経路によってもヒトに投与することができる。投与量は、患者の年齢、病態、体重などに応じ適宜決定されるが、通常は1日あたり没食子酸エステルとして0.01~100mg/kg体重、好ましくは0.1~100mg/kg体重の範囲から選ばれ、一回又は数回に分けて投与される。

【0013】本発明の製剤は、通常製剤に使用される賦形剤、その他の添加剤を含む組成物として使用するのが普通である。これらの例として、固体状のものとして

は、乳糖、カオリン、ショ糖、結晶セルロース、コーンスターチ、タルク、寒天、ペクチン、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、レシチン、塩化ナトリウムなどが挙げられ、液状のものとしてはグリセリン、落花生油、ポリビニルピロリドン、オリーブ油、エタノール、ベンジルアルコール、プロピレングリコール、水などが挙げられる。

【0014】剤形としては任意の形態を採ることができ、例えば錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、トロアチ剤などの固形製剤；シロップ、乳液、軟ゼラチンカプセル、クリーム、ゲル、ペースト、スプレー、注射などの液状製剤が挙げられる。

【0015】

【発明の効果】没食子酸エステルは、優れた細胞接着抑制作用を有し、かつ安全性も高いので、移植臓器拒絶反応、自己免疫疾患等の治療及び癌転移予防に有用である。

【0016】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに何ら限定されるものではない。

【0017】実施例1

白血球-血管内皮細胞接着抑制試験：96穴培養プレート上にコンフルエントとなったヒト血管内皮細胞に対し、最終濃度 $2 \times 10^{-6} \sim 10^{-3}$ Mとなるように被験化合物を添加した。18時間後にヒトIL-1 α を最終濃度5units/mlとなるように添加し、6時間培養する。培養液除去後、新しい培養液で2回洗浄した後、予め常法に従い蛍光標識したヒト末梢白血球 10^6 cells/mlを200 μ lを添加し、培養した。30分後、未接着細胞を除去し、接着細胞を溶解後その蛍光活性を測定した。その結果、表1に示すように没食子酸エステルは優れた細胞接着抑制効果を有することが判明した。

【0018】

【表1】

被 験 物 質 (μM)		白血球接着阻害率 (%)
没食子酸メチル	10	100
没食子酸メチル	5	82
没食子酸メチル	2	34
没食子酸エチル	10	95
没食子酸エチル	5	85
没食子酸エチル	2	27
没食子酸プロピル	10	100
没食子酸プロピル	5	100
没食子酸プロピル	2	82
没食子酸オクチル	10	100
没食子酸オクチル	5	100
没食子酸オクチル	2	84
没食子酸デシル	10	95
没食子酸デシル	5	93
没食子酸デシル	2	71
没食子酸エイコシル	10	98
没食子酸エイコシル	5	95
没食子酸エイコシル	2	73

【0019】実施例2

細胞接着に関与する細胞表面分子の抑制試験 (FACS can) : 25 cm² 培養フラスコ内にて、コンフルエントとなったヒト血管内皮細胞に対し、最終濃度 $2 \times 10^{-6} \sim 10^{-3}$ M となるように被験化合物を添加した。18時間後にヒト IL-1 α 又は TNF α を最終濃度 2.5 ng/ml となるように添加し、6時間培養した。培養液除去後、PBS (-) にて洗浄し、トリプシン-E DTA にて細胞を剥離、回収した。抗 ICAM-1、抗 ELAM-1 のそれぞれの抗体 (mouse IgG)

を一次抗体、また抗 mouse IgG-FITC を二次抗体とし、常法に従い細胞を染色後、FACS can による解析を行った。その結果、表2に示すように没食子酸エステルは、細胞表面の接着分子として、また免疫反応に関与する細胞表面因子として知られている ICAM-1 及び ELAM-1 の発現を強く抑制することが判明した。

【0020】

【表2】

被験物質 (μM)	接着分子発現抑制率 (%)	
	ELAM-1	ICAM-1
没食子酸メチル 10	73	65
没食子酸メチル 5	62	54
没食子酸メチル 2	24	19
没食子酸エチル 10	76	70
没食子酸エチル 5	75	68
没食子酸エチル 2	33	24
没食子酸プロピル 10	77	68
没食子酸プロピル 5	75	66
没食子酸プロピル 2	71	60
没食子酸オクチル 10	82	78
没食子酸オクチル 5	81	78
没食子酸オクチル 2	65	54
没食子酸デシル 10	82	66
没食子酸デシル 5	78	60
没食子酸デシル 2	67	54
没食子酸エイコシル 10	83	65
没食子酸エイコシル 5	83	64
没食子酸エイコシル 2	68	60

【0021】実施例3

癌細胞-血管内皮細胞接着抑制試験：96穴培養プレート上にコンフルエントとなったヒト血管内皮細胞に対し、最終濃度 $2 \times 10^{-6} \sim 10^{-8}$ Mとなるように被験化合物を添加した。18時間後にヒトIL-1 α を最終濃度5 units/mlとなるように添加し、6時間培養した。培養液除去後、新しい培養液で2回洗浄した後、予め常法に従い ^{51}Cr 標識したヒト骨髓腫瘍細胞 (HL

30 -60) 10^5 cells/mlを200 μ lを添加し、培養した。30分後、未接着細胞を除去し、接着細胞を溶解後その放射活性を測定した。その結果、表3に示すように没食子酸エステルは癌細胞の転移に重要な、癌細胞と血管内皮細胞との接着を強く抑制することが判明した。

【0022】

【表3】

被 験 物 質 (μM)		癌細胞接着阻害率 (%)
没食子酸メチル	10	99
没食子酸メチル	5	84
没食子酸メチル	2	37
没食子酸エチル	10	98
没食子酸エチル	5	87
没食子酸エチル	2	30
没食子酸プロピル	10	98
没食子酸プロピル	5	95
没食子酸プロピル	2	69
没食子酸オクチル	10	100
没食子酸オクチル	5	100
没食子酸オクチル	2	82
没食子酸デシル	10	97
没食子酸デシル	5	95
没食子酸デシル	2	61
没食子酸エイコシル	10	98
没食子酸エイコシル	5	96
没食子酸エイコシル	2	63

【0023】実施例4

血管内皮細胞に対する毒性（細胞形態、DNA合成）：
形態変化に関しては倒立顕微鏡による目視評価とし、DNA合成は常法に従い³H-TdR取り込み量を指標に
サンプル添加後24時間培養の最終8時間における取り
込み量を液体シンチレーションカウンターを用いて定量

30

評価した。なお、被験化合物濃度は $2 \times 10^{-6} \sim 10^{-5}$ Mとした。その結果、表4に示すように、没食子酸エステルは血管内皮細胞に対する毒性がほとんど認められなかった。

【0024】

【表4】

被 験 物 質 (μM)		DNA合成阻害率 (%)	形態変化
没食子酸メチル	10	3	なし
没食子酸メチル	5	2	なし
没食子酸メチル	2	0	なし
没食子酸エチル	10	5	なし
没食子酸エチル	5	5	なし
没食子酸エチル	2	0	なし
没食子酸プロピル	10	4	なし
没食子酸プロピル	5	3	なし
没食子酸プロピル	2	2	なし
没食子酸オクチル	10	3	なし
没食子酸オクチル	5	3	なし
没食子酸オクチル	2	1	なし
没食子酸デシル	10	4	なし
没食子酸デシル	5	2	なし
没食子酸デシル	2	1	なし
没食子酸エイコシル	10	4	なし
没食子酸エイコシル	5	3	なし
没食子酸エイコシル	2	3	なし

【0025】実施例5

免疫担当細胞（リンパ細胞）に対する毒性（DNA合成）：マウスリンパ節細胞を使用した。DNA合成は常法に従い³H-TdR取り込み量を指標にサンプル及びリンパ球刺激物質（IL-2：5 U/ml）添加後72時間培養の最終24時間における取り込み量を液体シン

チレーションカウンターを用いて定量評価した。なお、被験化合物濃度は $2 \times 10^{-6} \sim 10^{-8}$ Mとした。その結果、表5に示すように、没食子酸エステルは免疫担当細胞に対する毒性がほとんど認められなかった。

【0026】

【表5】

被験物質 (μM)		DNA合成阻害率 (%)
没食子酸メチル	10	3
没食子酸メチル	5	1
没食子酸メチル	2	1
没食子酸エチル	10	5
没食子酸エチル	5	3
没食子酸エチル	2	0
没食子酸プロピル	10	4
没食子酸プロピル	5	1
没食子酸プロピル	2	0
没食子酸オクチル	10	5
没食子酸オクチル	5	3
没食子酸オクチル	2	1
没食子酸デシル	10	4
没食子酸デシル	5	3
没食子酸デシル	2	1
没食子酸エイコシル	10	4
没食子酸エイコシル	5	1
没食子酸エイコシル	2	1

【0027】実施例6

皮膚刺激性：被験化合物（2%／エタノール）又は溶媒（エタノール）をヘアレスマウス背部に100 μl ずつ3カ月間塗布し、無処理皮膚との肉眼的差異につき観察*

*を行った。その結果、没食子酸エステルは、3カ月連続して皮膚に塗布してもなんら炎症を発生せず、安全性が高いことが確認された。

フロントページの続き

(72)発明者 時光 一郎

栃木県宇都宮市竹林町89-28

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.